Die automatische Kreatinbestimmung mit Hilfe der Diacetylreaktion und die Bedeutung des Kreatins für den menschlichen Organismus

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1971
vorgelegt von
Hans J o h a n n

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus der Urologischen Klinik der Universität
des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. C. E. Alken

Die automatische Kreatinbestimmung mit Hilfe der Diacetylreaktion und die Bedeutung des Kreatins für den menschlichen Organismus

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1971
vorgelegt von
Hans J o h a n n

Dekan: Prof. Dr. med. H. Kulenkampff
Referent: Prof. Dr. rer. nat. G. Gundlach
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. H. E. Keller

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mündliche Promotionsprüfung: 18. 8. 1971

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	4
Historischer Rückblick	
II. DIE BEDEUTUNG DES KREATINS FÜR DEN MENSCHLICHEN ORGANISMUS	5
1. Chemische und physikalische Eigenschaften des Kreatins	5
2. Synthese und Biosynthese von Kreatin	6
3. Orte der Biosynthese im Säugetierorganismus	8
4. Verteilung des Kreatins bzw. des Kreatinphosphats im menschlichen Organismus	8
5. Energiespeicher des menschlichen Organismus für die Muskelaktion	9
6. Die Bedeutung des ATP/ADP-Verhältnisses	10
7. Die zentrale Stellung des Kreatinphosphats im Säugetierstoffwechsel	11
8. Verbleib des Kreatins im Organismus	12
a) Umbau zu Kreatinin und Ausscheidung über die Nieren	12
b) Ausscheidung als Kreatin im Harn	13
aa) "Physiologische" Kreatinurie	13
bb) Pathologische Kreatinurie	14
III. DIE BEDEUTUNG DES KREATINNACHWEISES FÜR DIE KLINIK	16

Seite

IV. PROBLEMSTELLUNG 17

V. DIE AUTOMATISCHE KREATINBESTIMMUNG IN KÖRPERFLÜSSIGKEITEN 18

1. Die bisherigen Nachweismethoden für Kreatin 18

2. Nachteile der bisherigen Nachweismethoden 19

3. Automatische Analyse zur quantitativen Kreatinbestimmung 20

4. Material und Methoden 21

5. Reagenzien 21

6. Lösungen 22

7. Ausführung der Kreatinbestimmung und Aufbau der Autoanalyzereinheit 23

8. Eichkurve für die Kreatinbestimmung 24

9. Faktoren, welche die Farbbildung der Diacetylreaktion bei der Kreatinbestimmung beeinflussen 25

a) Abhängigkeit der Farbbildung von der Reagenzkonzentration 25

b) Abhängigkeit der Farbbildung von der Temperatur 26

c) Die Abhängigkeit der Umwandlung von Kreatinin zu Kreatin von der Wasserstoffionenkonzentration 29

10. Der Einfluß von Störsubstanzen auf die Kreatinbestimmung 31

11. Die Reproduzierbarkeit in Serie 34

12. Die Wiederfindungsquote von Kreatin in Serum und Harn 34

Seite

VI. NORMALWERTE 35

VII. KASUISTIK 39

VIII. ZUSAMMENFASSUNG 46

IX. ANHANG 50

X. LITERATURVERZEICHNIS 55

XI. DANKSAGUNG 64

XII. LEBENSLAUF 65

I. EINLEITUNG

Historischer Rückblick

Im Jahre 1835 erhielt der französische Chemiker Michel Eugène Chevreul von der Académie des Sciences in Paris den Auftrag, "unter dem Gesichtspunkt ihrer Zubereitung, des Preises und der Qualität die Fleischbrühe zu untersuchen, die seit einigen Jahren in Paris unter dem Namen BOUILLON von der COMPAGNIE HOLLANDAISE verkauft wird".

Bei seinen Untersuchungen entdeckte Chevreul (15) unter den festen organischen Bestandteilen der Fleischbrühe einen neuen Stoff, dem er den Namen Kreatin (aus dem Griechischen = Fleisch) gab und den er wie folgt beschrieb:

"Dieser Stoff ist bemerkenswert durch seine Klarheit und seine Kristalle, die die Form von rechtwinkligen Prismen anstreben, mit einem Perlmuttglanz, der besonders den kleinen Kristallen zu eigen ist, mit einem spezifischen Gewicht von 1,35 - 1,84, geruchlos und ohne wahrnehmbaren Geschmack. Mit Wasser auf rotem Kontaktpapier - Lackmus- oder Kurkumapapier - zerdrückt, verändert er nicht die Farben (des Kontaktpapiers). Er enthält Kristallisierungswasser, welches er bei 100° C abgibt, Sauerstoff, Wasserstoff, Kohlenstoff und Stickstoff, aber in einem Verhältnis, das man überhaupt nicht bestimmen kann".

Ferner stellte Chevreul fest, daß sich der neue Stoff gut in Wasser, HCl und verschiedenen anderen

organischen Säuren, jedoch nur in geringen Konzentrationen in Alkohol löst. Der Franzose gewann das Kreatin mit Hilfe von Alkohol aus einer wäßrigen Lösung des Fleischextraktes, und es ist verständlich, daß er auf diese Weise keine reine Substanz erhielt.

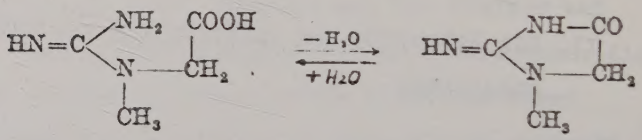
II. DIE BEDEUTUNG DES KREATINS FÜR DEN MENSCHLICHEN ORGANISMUS

1. Chemische und physikalische Eigenschaften des Kreatins (24)

Kreatin (Methylguanidinoessigsäure) hat ein Molekulargewicht von 131,14. In gereinigter Form liegt es als weißes Pulver aus sehr feinen Kristallen vor und ist gut in Wasser (1,35 g in 100 g H_2O bei 18° C), Säuren und Laugen löslich. In Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Lösungsmediums besteht dabei zwischen Kreatin und Kreatinin folgende Korrelation:

a) In wäßriger Lösung bei pH 7 befindet sich Kreatin im Gleichgewicht mit Kreatinin (s. Abb. 1). Dieses Gleichgewicht besteht jedoch nur in vitro. Im Säugetierorganismus gibt es nur einen Übergang

von Kreatinphosphat in Kreatinin (44). Injiziertes Kreatinin wird also vom Organismus nicht umgesetzt, sondern schnell und quantitativ (normale Nierenfunktion ist Voraussetzung) wieder ausgeschieden; eine Umwandlung in Kreatin findet in vivo nicht statt (14).



Kreatin Kreatinin

Abb. 1 "in vitro"-Gleichgewicht zwischen Kreatin und Kreatinin bei pH 7 (24)

b) In HCl gekocht, wandelt sich Kreatin quantitativ in Kreatinin um.

c) Im basischen Milieu findet eine vollständige Umwandlung von Kreatinin zu Kreatin statt.

2. Synthese und Biosynthese von Kreatin

Kreatin kann aus Methyl-Glykokoll (Sarkosin) und Cyanamid synthetisiert werden (37, 42, 50). Mit radioaktiven Isotopen wurde aber nachgewiesen, daß im Säugetierorganismus Kreatin aus Arginin, Glykokoll und Methionin entsteht (9). Dieser Vorgang erfolgt in zwei Stufen (58):

a) Zunächst entsteht aus Glycin (Glykokoll) und Arginin durch Transamidierung Guanidinoessigsäure unter Freisetzung von Ornithin (s. Abb. 2).

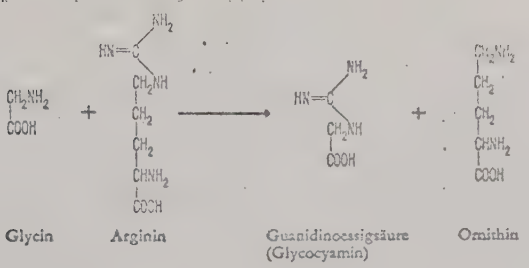


Abb. 2 Transamidierung des Glykokolls

b) Danach erfolgt die Übertragung des Methylrestes auf die Guanidinoessigsäure. Diese Transmethylierung wurde von Du Vigneaud (25) mit C^{14}-markiertem Methionin nachgewiesen (s. Abb. 3).

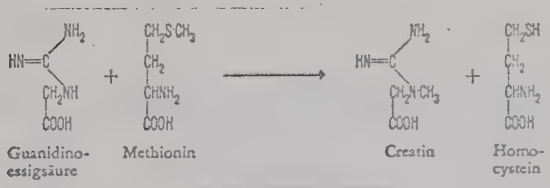


Abb. 3 Transmethylierung der Guanidinoessigsäure

Die Halbwertszeit von Kreatin im menschlichen Organismus wurde von Bloch und Schoenheimer (9) mit N^{15}-markiertem Kreatin mit 29 Tagen bestimmt.

3. Orte der Biosynthese im Säugetierorganismus

In der Niere (11) und nach neueren Befunden auch in der Bauchspeicheldrüse (39, 45) erfolgt die Bildung von Guanidinoessigsäure aus Glykokoll und Arginin. Die Transmethylierung der Guanidinoessigsäure geschieht sowohl in der Niere als auch in der Leber (11, 45). Borsock und Dubnoff (11) gelang es, diese Reaktion an Leberschnitten nachzuweisen. An nephrektomierten Ratten wurde mit C^{14}-markiertem Glykokoll eine extrarenale Kreatinsyntheserate von 60 % festgestellt (26). Die Abbildung 4 zeigt schematisch die einzelnen Phasen des Kreatinstoffwechsels.

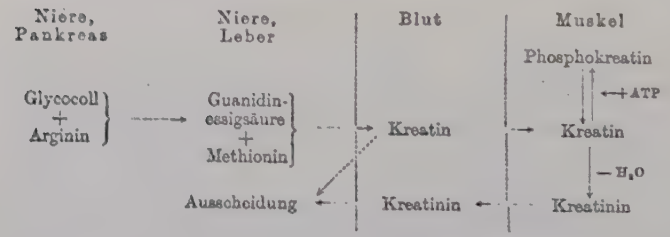


Abb. 4 Der Kreatinstoffwechsel im menschlichen Organismus (45)

4. Verteilung des Kreatins bzw. des Kreatinphosphats im menschlichen Organismus

Ungefähr 98 % des Gesamtkreatins des menschlichen Orga-

nismus entfallen auf die Muskulatur. Der größte Teil (bis zu 75 %) liegt als Kreatinphosphat vor, der Rest als freies Kreatin (14, 25, 18, 41). Der Gehalt an Kreatin und Kreatinphosphorsäure ist am größten in der quergestreiften Muskulatur, kleiner im Herzmuskel und gering in der glatten Muskulatur. Der Anteil an Kreatinphosphat beträgt 0,3 - 0,7 %, bezogen auf die Muskelmasse (18). Die Muskulatur besitzt nur eine geringe Speicherfähigkeit für Kreatin. Dagegen sind Leber und Niere zu einer Kreatinanreicherung auf das vier- bis fünffache ihrer normalen Kreatinkonzentration befähigt.

5. Energiespeicher des menschlichen Organismus für die Muskelaktion

Für plötzliche, extrem hohe Muskelleistungen stehen dem Organismus durch anaerob exergonisch verlaufende Reaktionen drei Energiereserven zur Verfügung (22, 36):

a) Zerfall des Glykogens in 2 Moleküle Milchsäure,
b) Zerfall der Kreatinphosphorsäure in Kreatin und Phosphorsäure,
c) Zerfall der Adenosintriphosphorsäure in Adenylsäure und Phosphorsäure.

Die eigentliche "Aktionssubstanz" ist die Adenosin-

triphosphorsäure (ATP), die durch hydrolytische Abspaltung des Phosphorsäurerestes die Energie für die Muskelkontraktion liefert. Das im Verlauf der Atmungskette bzw. der Glykolyse im Überschuß gebildete ATP überträgt sofort einen Phosphorsäurerest auf Kreatin, mit dem es im Gleichgewicht steht (36).

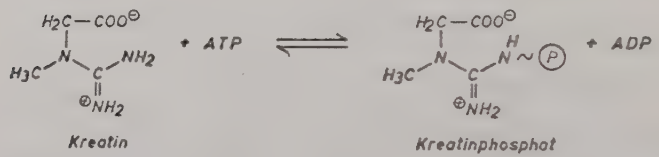


Abb. 5 "Lohmann-Reaktion"

Diese nach ihrem Entdecker "Lohmann-Reaktion" genannte reversible Übertragung des Phosphatrestes von ATP auf Kreatin verläuft in Gegenwart des "Lohmann-Enzyms" (Kinase) sehr schnell. Phosphorkreatin ist also der Energiespeicher für die sofortige Resynthese der stets nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegenden ATP (37, 46).

6. Die Bedeutung des ATP/ADP-Verhältnisses

Der Vorteil einer Regeneration des ATP aus Kreatinphosphat ergibt sich dadurch, daß kein ungünstiges ATP/ADP-Verhältnis entstehen kann, da die der Zelle wirklich zur Verfügung stehende Energie wesentlich

vom Konzentrationsverhältnis der Stoffe abhängt (36).

7. Die zentrale Stellung des Kreatinphosphats im Säugetierstoffwechsel

Nachdem 1926 die Kreatinphosphorsäure entdeckt wurde (18), konnte Lundsgaard (48) vier Jahre später die Bedeutung dieser Verbindung für die Muskelaktion nachweisen. Er vergiftete einen isolierten Muskel mit Monojodessigsäure und blockierte so die Glycerinaldehyddehydrogenase. Damit kam die Milchsäureproduktion zum Erliegen. Trotzdem war der Muskel aber noch zu einer beträchtlichen Anzahl von Zuckungen befähigt, wobei eine annähernd äquivalente Menge Kreatinphosphorsäure zerfiel.

Die Phosphorsäureverbindung des Kreatins ist in der Lage, verbrauchtes ATP schnell und ohne Energieverlust zu regenerieren. Bei den Wirbellosen wird die Funktion des Kreatinphosphats von Argininphosphat erfüllt (36, 50). Die Abbildung 6 gibt einen Überblick über die Bedeutung des Kreatinphosphats sowie seine zentrale Stellung bei allen Stoffwechselfunktionen des menschlichen Organismus.

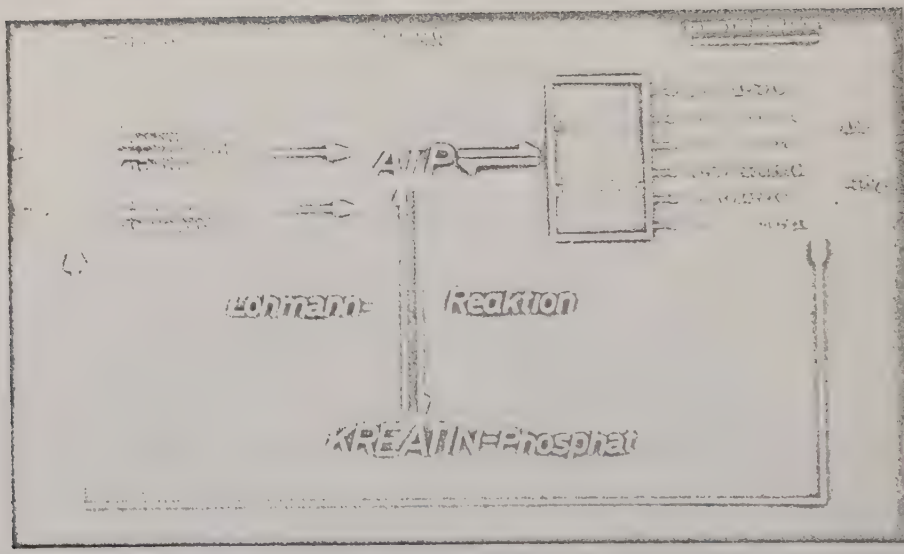


Abb. 6 Schematische Darstellung der zentralen Stellung des Kreatinphosphats im Stoffwechselgeschehen des menschlichen Organismus, modifiziert nach H. R. Christen (16)

8. Verbleib des Kreatins im menschlichen Organismus

a) Umbau zu Kreatinin und Ausscheidung über die Nieren

Durch Isotopenversuche haben Bloch und Schoenheimer nachgewiesen, daß das gesamte im Urin ausgeschiedene Kreatinin aus dem Kreatin stammt (8). Die Entstehung von Kreatinin in vivo setzt allerdings die Bildung von Kreatinphosphat voraus. Eine direkte Umwandlung von Kreatin in Kreatinin

ist dem Organismus nicht möglich (12, 44). Möglicherweise spielt hier die Niere bei der Umwandlung eine Rolle, da das Blut eine relativ große Menge Kreatin enthält, im Harn jedoch (unter physiologischen Bedingungen) fast nur Kreatinin ausgeschieden wird (23). Kreatinin ist Stoffwechselendprodukt. Zugeführtes Kreatinin wird unverändert und beinahe quantitativ im Harn ausgeschieden (7).

b) Ausscheidung als Kreatin im Harn

aa) "Physiologische" Kreatinurie

Die Kreatinausscheidung im Urin zeigt eine starke Abhängigkeit von der Muskelmasse des Körpers, vom Alter und vom Geschlecht (1). Der gesunde Erwachsene scheidet im Harn nur Spuren von Kreatin aus. Dabei sind die Werte der Frau gegenüber denen des Mannes leicht erhöht. Bei graviden Frauen, im Puerperium, während der Laktationsperiode und der Mensis erhöht sich die Kreatinausscheidung im Harn (47). Ebenso findet man bei Kindern vor der Pubertät wie bei alten Männern mit erloschener Geschlechtsfunktion eine über der Norm liegende Kreatinurie. Das gleiche Ergebnis zeigen Kastraten, bei denen die Kreatinausscheidung nach Testosterongaben wieder zur Norm zurückgeht (1, 23, 34, 58).

bb) Pathologische Kreatinurie

Bei einer Reihe von Krankheitsbildern ist die Kreatinausscheidung im Harn signifikant erhöht. Ganz im Vordergrund stehen dabei die degenerativen Muskelerkrankungen. Bei wenigen anderen chronischen Leiden ist dagegen die Kreatinausscheidung herabgesetzt. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Erkrankungen, die mit einer Abweichung von der physiologischen Kreatinelimination einhergehen:

Tabelle 1 Erkrankungen, die von einer erhöhten bzw. erniedrigten Kreatinausscheidung begleitet werden

Kreatinausscheidung im Harn erhöht	Kreatinausscheidung im Harn erniedrigt
Dermatomyositis (20, 39, 47)	Myotonia congenita (25, 31, 40)
Dystrophia musculorum progressiva (1, 20, 25, 31, 41, 43, 44, 55)	Pubertas praecox (20)
Myastenia gravis (25, 31, 40)	Hypothyreose (24, 31, 40, 58)
Hyperthyreose (1, 20, 24, 36, 40, 55)	
M. Addison (7, 38)	
Hochfieberhafte Erkrankungen (31, 38)	
Unterernährung (40)	
Diabetes mellitus (24, 30)	
Akromegalie (24)	
Cushing-Syndrom (24)	

Zu einer signifikanten Kreatinurie kommt es immer dann, wenn eine Störung des Muskelstoffwechsels vorliegt, wie das z. B. bei den progressiven Muskeldystrophien und der Dermatomyositis der Fall ist. Die Ursache der mit diesen Erkrankungen verbundenen erhöhten Kreatinausscheidungen ist wahrscheinlich eine Verminderung der Fähigkeit, Kreatin zu Kreatinphosphat zu phosphorylieren (41). Dafür spricht auch die gleichzeitig bestehende Hypokreatininurie, da in vivo Kreatinin nur aus dem Zerfall von Phosphokreatin entsteht (12, 44).

Bei der Hyperthyreose wird die thyreotoxische Myopathie mit Kreatinurie ebenfalls durch die Störung im Phosphokreatin-Stoffwechsel verursacht. Daraus resultiert große Schwäche, die sich bis zur Adynamie bzw. bis zur Myastenia pseudoparalytica steigern kann (55).

Testosteron bewirkt eine Abnahme der Kreatinausscheidung. Daher findet man bei der Pubertas praecox eine relative Hypokreatinurie, d. h. ein Aufhören der Kreatinausscheidung wie beim Erwachsenen (1, 20).

Auch nach 11- bis 17-tätiger Immobilisierung durch Bettruhe sollen bereits Harnkonzentrationen bis zu 800 mg/24 h gefunden werden (24).

III. BEDEUTUNG DES KREATINNACHWEISES FÜR DIE KLINIK

Der Kreatinnachweis zählt selbst in größeren Krankenanstalten nicht zu den in der Klinik eingeführten Routineuntersuchungen. Die Ursache ist wohl in den bisher üblichen Nachweismethoden zu sehen, deren materieller und zeitlicher Aufwand in einem derartigen Mißverhältnis zu den erzielten Resultaten steht, daß weitgehend auf die Einführung eines Kreatinnachweises verzichtet wird. Trotzdem ist aber die Untersuchung des Kreatin-Serumspiegels und der Kreatinausscheidung im Harn gerade bei den degenerativen Muskelerkrankungen von großem Wert. Bei diesen chronischen Leiden erzielt man durch einen zusätzlichen oralen Belastungstest ganz eindeutige Untersuchungsergebnisse. Da bei Muskeldystrophikern zugeführtes Kreatin fast quantitativ ausgeschieden wird, ist es möglich, die echten Myopathien gegenüber anderen Muskelatrophien abzugrenzen (20, 25, 32, 38, 39, 55).

Mit der von uns erarbeiteten Methode konnten wir für die Universitäts-Hautklinik in zwei Fällen eine Dermatomyositis bestätigen bzw. letzte Zweifel an der gestellten Diagnose zerstreuen. In einem weiteren Fall, bei dem Muskelschwäche und Hautefloreszenzen für eine Dermatomyositis sprachen, war es uns möglich, durch Bestimmung der Kreatinkonzentration in Harn und Serum diese Erkrankung auszuschließen.

Auch im Hinblick auf einige andere in Tabelle 1 genannte Krankheitsbilder (z. B. Myotonia congenita) scheint es sinnvoll, die gestellte Diagnose durch einen zusätzlichen Kreatinnachweis zu erhärten.

Bei einem primären prä- und postpuberalen Hodenschaden (mit Androgenmangel) können die inkretorischen Ausfallerscheinungen durch permanente Substitutionstherapie verhütet werden. Die Überprüfung des Kreatin/Kreatinin-Quotienten bietet hier eine zusätzliche und gute Kontrollmöglichkeit des Therapieerfolges. Wird der Quotient ($\frac{\text{Kreatin}}{\text{Kreatinin}} \times 100$) z. B. größer, so bedeutet das einen Wirkungsabfall des Testosterons (23).

Bei Diabetes mellitus soll die Kreatinurie eine besondere Bedeutung haben, "da sie als feiner Indikator für Stoffwechselverschlechterungen des Zuckerkranken angesehen werden kann und der Kreatingehalt im Harn schon vor Auftreten von Ketonkörpern ansteigt" (30).

IV. PROBLEMSTELLUNG

Die Position des Kreatins im Stoffwechsel und die Bedeutung für Nachweis und Diagnose verschiedener

Erkrankungen veranlaßten uns, eine verbesserte Bestimmungsmethode zu suchen, die sich durch möglichst große Zuverlässigkeit auszeichnet und für Reihenbestimmungen geeignet ist.

V. DIE AUTOMATISCHE KREATINBESTIMMUNG IN KÖRPERFLÜSSIGKEITEN

1. Die bisherigen Nachweismethoden für Kreatin

Drei Verfahren haben sich in der Vergangenheit im wesentlichen zur Ermittlung des Kreatingehaltes biologischer Flüssigkeiten angeboten:

a) Umwandlung des Kreatins zu Kreatinin mit anschließender Bestimmung des Gesamtkreatinins meist mit alkalischer Pikrinsäure (4, 17, 43),

b) direkte kolorimetrische Bestimmung der Methylguanidogruppe des Kreatins mit Diacetyl und α-Naphthol (3, 19, 35, 53),

c) die enzymatische Umwandlung des Kreatins zu Kreatinphosphat und indirekte Messung der

gebildeten Adenosindiphosphorsäure (5, 43).

2. Nachteile der bisherigen Nachweismethoden

Allen genannte Methoden haften Ungenauigkeiten an, die insbesondere durch die mangelnde Spezifität der Farbreaktionen oder durch umständliche Verfahren bedingt sind. Besonders schwierig gestaltet sich der Nachweis von geringen Mengen Kreatin neben hohen Kreatininkonzentrationen, wie z. B. im Harn.

Die analytischen Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Kreatingehaltes in Serum und Urin haben immer wieder zu Verbesserungsvorschlägen geführt. Jedoch konnten auch die modifizierten Verfahren keinen Eingang in die Klinik finden. Einerseits sind viele der Kreatinnachweise noch immer mit einer hohen Fehlerquote behaftet (4, 17, 43), andererseits erfordern die spezifischeren enzymatischen Methoden einen derartigen Aufwand an Zeit, teuren leicht verderblichen Reagenzien und geschultem Personal (5, 43), so daß sich ihre Einführung in den Routinebetrieb der Klinik von selbst verbietet.

Aus diesen Gründen wird heute in wachsendem Umfang die Automatisierung serienmäßig durchzuführender Bestimmungen notwendig. Aber auch bei einer kleinen Anzahl zu untersuchender Proben kann die

Automation sinnvoll werden. Die Konstanz z. B. der Parameter Zeit und Temperatur ist in der Automation besser als bei "Handmethoden". Der Einfluß von Störsubstanzen und -faktoren kann u. U. vernachlässigt werden.

3. Automatische Analyse zur quantitativen Kreatinbestimmung

Für den Kreatinnachweis mit Hilfe des Diacetylreagenzes hat sich daher die automatische Analyse als Methode der Wahl erwiesen. Die Diacetyl-α-Naphtholreaktion zur quantitativen Kreatinbestimmung von Barrit (3) in der Abwandlung von Eggleton (19), Raaflaub (53), Kanig (35) wurde erstmals von Griffith (27) automatisiert beschrieben. Diese Reaktion muß in alkalischer Lösung durchgeführt werden, wobei laufend Kreatinin in Kreatin überführt wird. Griffith bestimmte daher in seinen auf Kreatin zu untersuchenden Proben gleichzeitig das vorhandene Kreatinin für den Korrekturfaktor.

Durch Senkung der Reaktionstemperatur konnten wir die während der Farbbildung stetig erfolgende Neubildung von Kreatin aus Kreatinin in der stark basischen Lösung - besonders bei der Untersuchung von Harn - fast gänzlich unterdrücken (29). Damit entfällt auch die Bestimmung des Kreatinins für den Korrektur-

faktor bzw. das bei den meisten "Handmethoden" obligatorische zweizeitige Messen (35, 53).

4. Material und Methoden

Das Hauptproblem bei der Bestimmung des Kreatins in biologischen Flüssigkeiten mit Hilfe der Diacetylreaktion ist, wie bereits erwähnt, die stetige Umwandlung von Kreatinin in Kreatin im stark alkalischen Milieu. Dieser Störfaktor macht sich besonders bei der Untersuchung von Harn bemerkbar. In einer Serie von über 250 Versuchen haben wir die Abhängigkeit dieser Umwandlung von der Temperatur, der Zeit und der Wasserstoffionenkonzentration untersucht. Ferner wurde die Abhängigkeit der Farbbildung von den Reagenzkonzentrationen bzw. von der Temperatur bei konstanter Zeit sowie der Einfluß von Störsubstanzen geprüft.

Auf Grund unserer Untersuchungsergebnisse halten wir die folgenden Reagenzien, Lösungen und die nachstehend beschriebene Ausführung der automatischen Kreatinbestimmung in biologischen Flüssigkeiten am geeignetsten.

5. Reagenzien

α-Naphthol krist.reinst (Merck 6221),

Butandion (2,3), 99 - 100 % (Schuchardt, München),
Natriumcarbonat p. a. wasserfrei (Merck 6392),
Natriumhydrogencarbonat p. a. (Merck 6329),
Natriumchlorid p. a. (Merck 6404),
Kreatin (Merck 5205), Serva chromatographisch rein,
Kreatinin (Merck 5206), Serva chromatographisch rein,
alle anderen Substanzen waren, wenn nicht anders vermerkt, analysenrein.

6. Lösungen

0,9 % Natriumchlorid + 1 ml einer 25 proz. Detergenzlösung (Brij 35) pro Liter.
Butandion 1 proz. in aqua dest. Direkt vor der Verwendung wird 1 : 25 verdünnt mit aqua dest.
α-Naphthol-Lösung 3 proz. in Natriumcarbonat-Natriumhydroxid-Puffer. Diese Lösung muß vor jedem Versuch frisch angesetzt werden. Sie ist dann mindestens für 3 Stunden bei Raumtemperatur haltbar. Jedes Schütteln und Rühren während des Versuches ist zu vermeiden.
Natriumcarbonat-Natriumhydroxid-Puffer:
60 g Natriumhydroxid und 160 g Natriumcarbonat (wasserfrei) werden mit aqua dest. zu 1 l gelöst. Die Lösung ist bei Raumtemperatur haltbar.
Kreatineichlösungen:
10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ppm Kreatin.

7. Ausführung der Kreatinbestimmung und Aufbau der Autoanalyzereinheit

Die zu analysierende Probe wird mit der Natriumchloridlösung verdünnt einer Dialysatoreinheit zugeführt und gegen eine Natriumchloridlösung dialysiert. Das Dialysat wird auf + 7,5° C gekühlt, mit dem Diacetylreagenz versetzt und nach Durchlaufen einer Mischspirale weiter mit dem Naphtholreagenz zusammengebracht.

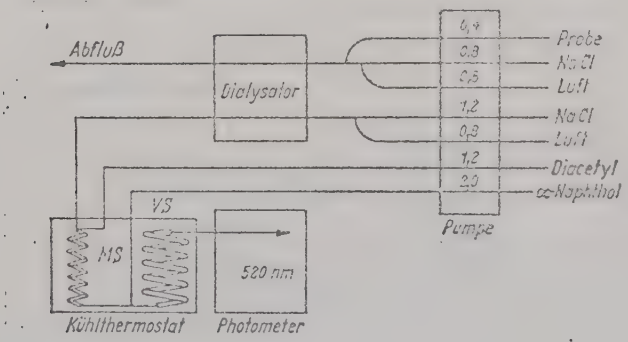


Abb. 7 Aufbau der Autoanalyzereinheit. Die Zahlenangaben bezeichnen die ml/Min. gefördertes Reagenz bzw. Probe.
MS = Mischspirale
VS = Verzögerungsspirale

Zur Farbentwicklung durchläuft dieses Gemisch eine etwa 8 m lange Glasspirale. Die Inkubationszeit der Reaktionslösung beträgt 9,3 Min. Die Farbtiefe wird bei 520 nm mit Hilfe eines Doppelstrahlkolorimeters registriert. Das Verhältnis der Reagenzien zueinan-

der geht aus dem Fließdiagramm in Abbildung 7 hervor. Die günstigste Probenfrequenz ergab sich bei 40 Proben/Std.

8. Eichkurve für die Kreatinbestimmung

Die oben beschriebene Methodik erlaubt die Bestimmung von 0 - 100 ppm Kreatin. Dabei ergibt sich eine lineare Abhängigkeit zwischen Extinktion und Konzentration (Abb. 8). Die Empfindlichkeit der Methode beträgt 0,5 ppm.

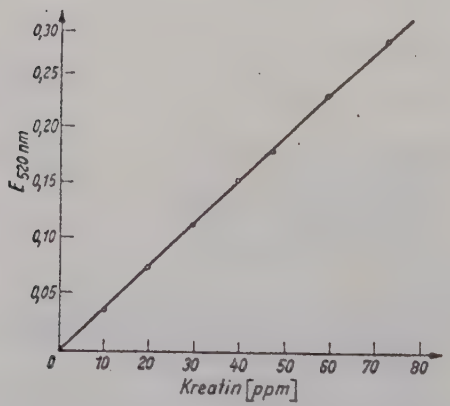


Abb. 8 Eichkurve für die Kreatinbestimmung

9. Faktoren, welche die Farbbildung der Diacetylreaktion bei der Kreatinbestimmung beeinflussen

a) Abhängigkeit der Farbbildung von der Reagenzkonzentration

Der Einfluß unterschiedlicher Reagenzkonzentrationen auf die Farbausbeute geht aus Tabelle 2 hervor. Danach ist eine möglichst geringe Konzentration an Diacetyl für die Farbbildung am günstigsten. Bei der Verwendung von 20 ppm Diacetyl findet man jedoch bei höheren Kreatinkonzentrationen keine lineare Zunahme der Extinktion.

Tabelle 2 Abhängigkeit der Farbbildung von Reagenzkonzentrationen

	Konzentration der Reagenzlösung	relative Farbbildung* in %
Butandion ppm	1000 40 20	88 100 105
α-Naphthol %	4 6 8	84 96 100
alkal. Puffer	unverdünnt 3 : 1 verd. 1 : 1 verd.	100 50 25

*Angegebene Zahlen beziehen sich auf die verwandte Standardkonzentration

Eine zunehmende Konzentration an α-Naphthol steigert die Farbausbeute. Höhere Konzentrationen als 8 % verbieten sich wegen der Löslichkeit der Substanz bei z. B. 5° C. Eine Senkung der Pufferkonzentration führt zu einer drastischen Verminderung der Farbintensität. Verdünnung des Puffers 1 : 1 mit dest. Wasser senkt die Farbbildung auf 25 %, verdünnt man 3 : 1, beträgt die Farbbildung etwa 50 %. Höhere Pufferkonzentrationen führen zur Ausfällung der Substanzen bei niederer Temperatur und beschleunigen die Umwandlung von Kreatinin zu Kreatin.

b) Abhängigkeit der Farbbildung von der Temperatur

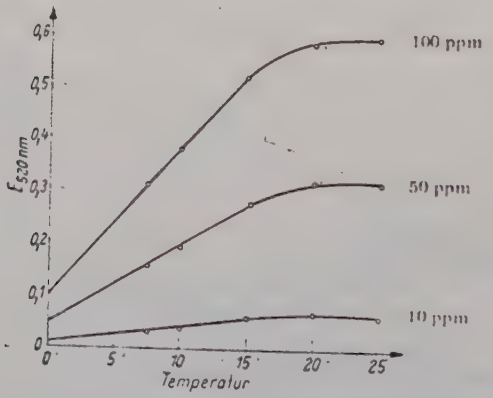


Abb. 9 Farbbildung des Kreatins in Abhängigkeit von der Temperatur bei konstanter Zeit

Die Bildung des Farbkomplexes ist bei konstanter Reaktionszeit abhängig von der Reaktionstemperatur. Aus Abbildung 9 geht hervor, daß unter den beschrie-

benen Standardbedingungen die Farbausbeute unter 15° C linear mit der Temperatur zunimmt. Die Umwandlung von Kreatinin zu Kreatin nimmt jedoch erwartungsgemäß (Abb. 10) mit steigender Temperatur exponentiell zu.

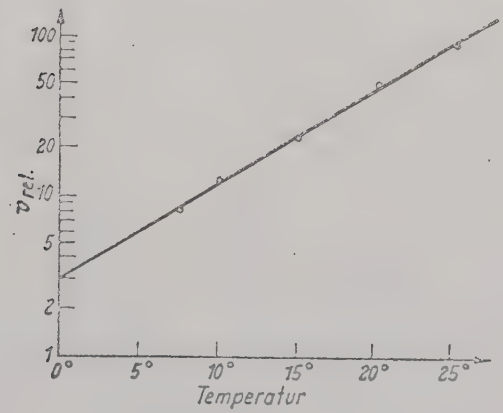


Abb. 10 Abhängigkeit der Umwandlung von Kreatinin zu Kreatin von der Temperatur unter den angegebenen Standardbedingungen. Die relative Umwandlungsgeschwindigkeit wurde logarithmisch aufgetragen.

Eine Senkung der Reaktionstemperatur führt zwar zu einer Verminderung der Farbausbeute, gleichzeitig aber zu einer überproportionalen Verringerung der Kreatinin-Kreatin-Umwandlung. Bei 7,5° C beträgt die Farbausbeute der Reaktion etwa 50 % der bei Raumtemperatur zu erwartenden. An "scheinbarem Kreatin" aus der Kreatinin-Kreatin-Umwandlung fin-

den sich indessen, verglichen mit der Raumtemperatur, nur 9 %. Das bedeutet, daß in Gegenwart von 2000 ppm Kreatinin unter den von uns gewählten Bedingungen lediglich 1,5 ppm als "scheinbares Kreatin" auftreten (Abb. 11). Diese Konzentration führt auch in Gegenwart kleiner Mengen echten Kreatins, wie es im Harn zu finden ist, zu vernachlässigbaren Fehlern.

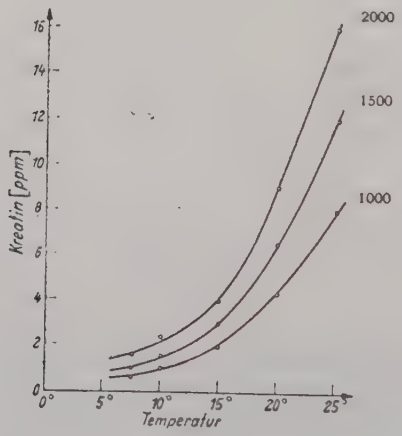


Abb. 11 Umwandlung von Kreatinin zu Kreatin in Abhängigkeit von der Temperatur während der Reaktion bei konstanter Inkubationszeit. Die Zahlen an den Kurven beziehen sich auf die Anfangskreatininkonzentration in ppm.

Die für diese Untersuchungen herangezogenen Kreatininlösungen müssen stets frisch angesetzt werden. Frische Lösungen enthalten weniger als 0,05 % Kreatin, während eine bei 2° C drei Wochen lang aufbe-

wahrte Lösung 0,5 % Kreatin bezogen auf das Kreatinin enthält.

c) Die Abhängigkeit der Umwandlung von Kreatinin zu Kreatin von der Wasserstoffionenkonzentration

Wesentlich größer als der analytische Fehler ist die Umwandlung vorhandenen Kreatinins zu Kreatin in biologischen Flüssigkeiten, bevor die Probe zur Analyse gelangt. Im Harn des erwachsenen Menschen findet sich eine mittlere Kreatininkonzentration von 1700 ppm (24). Bereits in den harnableitenden Wegen und in der Blase kann sich die Umwandlung vollziehen. Abbildung 12 und Tabelle 3 geben eine Darstellung dieser Reaktion in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration.

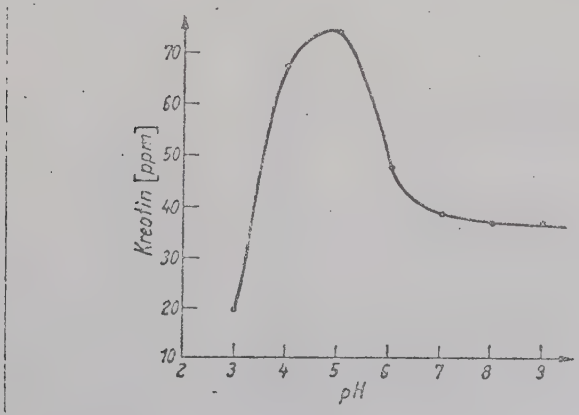


Abb. 12 Abhängigkeit der Umwandlung von Kreatinin zu Kreatin vom pH.
Bedingungen: 2000 ppm Kreatinin,
Temperatur: 40° C,
Inkubationszeit: 24 Stdn.

Tabelle 3 Umwandlung von Kreatinin in Kreatin in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration. Die Ausgangslösung enthielt 2000 ppm Kreatinin und hatte zur Einstellung des pH bereits bei Raumtemperatur gestanden.

Zeit (Stdn.)	pH	Kreatin (ppm) gefunden nach Inkubation bei:		
		3° C	22° C	39° C
0	3	-	2,0	-
	4	-	3,6	-
	5	-	3,8	-
	6	-	2,4	-
	7	-	2,0	-
	8	-	2,0	-
	9	-	2,0	-
3	3	2,6	3,0	4,4
	4	4,0	5,0	9,2
	5	4,4	5,6	9,8
	6	3,4	4,4	6,6
	7	2,5	4,0	6,4
	8	2,4	3,8	5,9
	9	2,4	3,8	6,0
6	3	2,5	3,0	6,6
	4	3,6	6,0	16,8
	5	4,2	6,8	17,8
	6	3,2	5,0	11,8
	7	3,2	4,4	9,8
	8	3,0	4,2	9,8
	9	3,0	4,2	9,6
12	3	2,2	3,8	11,0
	4	4,2	8,6	33,0
	5	4,4	12,0	35,0
	6	3,3	6,4	22,0
	7	2,8	5,0	18,0
	8	2,8	5,0	17,0
	9	2,9	4,8	17,0
24	3	2,8	6,4	20,0
	4	5,6	17,4	67,5
	5	6,2	19,4	74,0
	6	4,4	11,6	47,5
	7	3,6	9,4	39,0
	8	3,7	9,2	37,5
	9	3,6	9,2	37,5

Bei pH 5 durchläuft diese Reaktion ein Maximum. Da die pH-Werte des Harnes normalerweise zwischen 5,5 und 7 schwanken, muß man mit Reaktionsgeschwindigkeiten rechnen, die um den Faktor von nahezu 2 im physiologischen Bereich unterschieden sind. Ein nächtlich produzierter, morgens ausgeschiedener Harn (pH 5, mit einer angenommenen mittleren Verweildauer in der Blase von 6 Stunden) kann somit die Konzentration von etwa 10 ppm Kreatin vortäuschen. Es ist daher besonders wichtig, daß der frische Harn sofort gekühlt und angesäuert bis zur Analyse aufbewahrt wird. In einem 24-Stunden-Harn finden sich dann höchstens weitere 5 ppm Kreatin. Auf den Tagesharn umgerechnet können also bis zu 15 mg Kreatin nachgewiesen werden, die ursprünglich nicht vorhanden waren.

10. Der Einfluß von Störsubstanzen auf die Kreatinbestimmung

Die alkalische Diacetylreaktion ist eine allgemeine Reaktion für Guanidine, bei denen mindestens eine freie Aminogruppe vorhanden sein muß (53). Der Einfluß von Arginin, Methylguanidin und Glycocyamin auf die Spezifität der Reaktion in bezug auf Kreatin wurde deshalb geprüft. Diese Substanzen sollen bei Raumtemperatur etwa 10 % ihrer Konzentration an Kreatin vortäuschen (43). Durch Senkung der Reaktionstempe-

ratur konnte die Spezifität der alkalischen Diacetylreaktion verbessert werden. Glycocyamin und Arginin täuschen weniger als 3,5 % der Farbausbeute gleicher Mengen an Kreatin vor. Durch den Einfluß dieser Substanzen werden also unter unseren Bedingungen und bei normaler Ausscheidung durch die Niere (2, 24) etwa nur 4 mg/Tag Kreatin zuviel gemessen (Tab. 4).

Tabelle 4 Einfluß von Störsubstanzen auf die Kreatinbestimmung bei 7,5° C

Substanz	Konzentration (ppm)	scheinbare Kreatinkonzentration (ppm)	Farbintensität in % der Kreatinreaktion
Glycocyamin	200	7	3,5
Arginin	100	3	3
Methylguanidin	1000	25	2,5
Harnstoff	20000	0	0
Harnsäure*	500	0	0
Cystin	100	0	0
Alanin	100	0	0
Glycin	100	0	0
Histidin	100	0	0
Isoleucin	100	0	0
Leucin	100	0	0
Lysin	100	0	0
Methionin	100	0	0
Phenylalanin	100	0	0
Threonin	100	0	0
Tryptophan	100	0	0
Tyrosin	100	0	0
Valin	100	0	0

*Harnsäure allein senkt die Grundlinie. In Gegenwart von Kreatin (20 ppm) ergibt sich keine meßbare Verminderung der Farbintensität.

Auf nicht mehr als 10 mg steigt dieses "scheinbare Kreatin" bei erhöhter Exkretion Guanidogruppen enthal-

tender Verbindungen z. B. bei progressiver Muskeldystrophie an (33, 56). Bei der gleichzeitig stark vermehrten Kreatinausscheidung spielt diese Menge eine geringe Rolle. Selbst bei der enzymatischen Methode mit Kreatinphosphokinase wird Glycocyamin zu 2,5 % miterfaßt (43). Diese Methode benötigt außerdem viel Ausgangsmaterial und die Wiederfindungsquote liegt zwischen 86 % und 110 % (43). Ein Einfluß anderer potentieller Störsubstanzen wie Harnsäure, Harnstoff und verschiedener Aminosäuren (35) ließ sich in unserem Verfahren nicht nachweisen, und der Harn mußte nicht - zur Ausschaltung von Störsubstanzen (27, 53) - verdünnt werden.

Da die Umwandlung des Kreatinins in den harnableitenden Wegen in der gleichen Größenordnung wie der durch Störsubstanzen bedingte Fehler liegt, scheint uns eine chromatographische (52, 54) oder elektrophoretische (21) Abtrennung des Kreatins, um die Genauigkeit zu erhöhen, nicht sinnvoll. Die Entfernung "störender Substanzen" aus dem Urin durch Ätherextraktion und aus dem Serum durch Behandlung mit Jod mit nachfolgender Ätherextraktion, wie sie von H. Taussky (57) empfohlen wird, ist bei unserer Methode nicht notwendig. Bei der Untersuchung von Serum treten die Störfaktoren und der Fehler, der durch das Kreatinin bedingt

ist, nicht mehr hervor.

11. Die Reproduzierbarkeit in Serie

Bei diesem Versuch benutzten wir eine wäßrige Lösung mit 50 ppm Kreatin. Bei 41 Wertungen beträgt die Standardabweichung s = 0,68, der Variationskoeffizient V = 1,05 % (Fehlerrechnung s. Anhang), womit eine gute Reproduzierbarkeit in Serie gegeben ist.

12. Die Wiederfindungsquote von Kreatin in Serum und Harn

Zur Feststellung der Wiederfindungsquote benutzten wir einen Sammelharn von zwei Probanden. Die Gesamtmenge von 400 ml wurde nach guter Durchmischung in 4 gleiche Portionen von je 100 ml geteilt. Eine Probe blieb ohne Kreatin-Zusatz, während den drei anderen 100, 200 und 300 ppm Kreatin zugesetzt wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Wir fanden mit unserer Bestimmungsmethode in den Harnproben 99 - 100 % des vorher hinzugefügten Kreatins. Die Versuche mit Seren brachten die gleichen Resultate. Der Fehler liegt im Bereich des Variationskoeffizienten V = 1,05 %.

Tabelle 5 Wiederfindungsquote von Kreatin im Harn

Probe Nr.	Harnproben	Kreatin-Sollwert ppm	wiedergefundenes Kreatin ppm	wiedergefundenes Kreatin %
1	Harn ohne Kreatin	190	-	-
2	Harn + 100 ppm Kreatin	290	290	100
3	Harn + 200 ppm Kreatin	390	390	100
4	Harn + 300 ppm Kreatin	490	488	99,59

VI. NORMALWERTE

Die in der Literatur angegebenen Normalwerte für Kreatinkonzentrationen in Serum und Harn (13, 22, 30, 31, 38, 43, 47, 51, 55) weichen sehr stark voneinander ab. In einer bei E. Flaschenträger (22) veröffentlichten Zusammenstellung von 9 Autoren über Kreatin-Normalwerte im Serum findet man z. B. Werte zwischen 0,0 und 4,3 mg % Kreatin. Die meisten der angegebenen Werte sind im Vergleich mit den von uns gefundenen Normalwerten zu hoch. Das gilt insbesondere für die Harnkreatinwerte.

Die Ursache dieser unterschiedlichen Angaben ist in den bisher üblichen Nachweismethoden (3, 4, 5, 17, 19, 35, 43, 53) zu suchen, mit denen mehr oder weniger große Mengen an "Pseudokreatin" (Kreatinin, Harnstoff, Aminosäuren usw.) mitbestimmt wurden.

Wir haben mit unserer Nachweismethode Serum und Harn von 15 männlichen und 12 weiblichen gesunden erwachsenen Versuchspersonen untersucht. Von diesen Personen wurden an 3 aufeinanderfolgenden Tagen Serum- und Harn-Nüchternproben auf ihre Kreatinkonzentration geprüft. Die Mittelwerte aus diesen 3 Bestimmungen legten wir der Berechnung der Normalwerte zugrunde.

Die Gewinnung der zu untersuchenden Proben geschah wie folgt: Bei der morgendlichen Blutentnahme wurden die Versuchspersonen aufgefordert, die Harnblase völlig zu entleeren. Dieser Harn mit hoher Verweildauer in der Blase und daher hoher Kreatin-Konzentration wurde verworfen. Eine Stunde später wurden die Versuchspersonen erneut zum Harnlassen aufgefordert und die nun gewonnenen Harnproben sofort mit den zuvor gewonnenen Seren auf ihre Kreatinkonzentration untersucht.

Tabelle 5 zeigt die Kreatinkonzentrationen in Serum und Harn von 15 männlichen gesunden Versuchspersonen im Erwachsenenalter. Wir fanden einen Mittelwert von 0,56 mg % (s = 0,095, V = 17,0 %) im Serum und von

0,141 mg % (s = 0,049, V = 34,8 %) im Harn (Fehlerrechnung s. Anhang).

Tabelle 5 Kreatinkonzentrationen in Serum und Harn von 15 gesunden männlichen Versuchspersonen im Erwachsenenalter

Proband Nr.	Alter Jahre	Serum-Kreatin (mg%) 1.Tag	2.Tag	3.Tag	M.W.*	Harn-Kreatin (mg%) 1.Tag	2.Tag	3.Tag	M.W.*
1	21	0,42	0,55	0,88	0,62	0,20	0,31	0,11	0,21
2	22	0,62	0,79	0,58	0,66	0,08	0,20	0,10	0,13
3	32	0,67	0,71	0,38	0,59	0,16	0,18	0,12	0,15
4	31	0,40	0,54	0,47	0,47	0,05	0,20	0,07	0,11
5	20	0,63	0,69	0,52	0,61	0,10	0,08	0,15	0,11
6	39	0,69	0,56	0,60	0,62	0,25	0,10	0,08	0,14
7	25	0,44	0,70	0,62	0,59	0,14	0,07	0,17	0,13
8	40	0,43	0,48	0,39	0,43	0,30	0,15	0,25	0,23
9	24	0,61	0,58	0,47	0,55	0,18	0,28	0,10	0,19
10	28	0,57	0,78	0,61	0,65	0,07	0,12	0,10	0,10
11	24	0,69	0,67	0,55	0,64	0,05	0,05	0,23	0,11
12	20	0,54	0,51	0,59	0,55	0,15	0,18	0,10	0,14
13	27	0,32	0,29	0,37	0,33	0,06	0,10	0,04	0,07
14	27	0,51	0,32	0,80	0,61	0,26	0,18	0,20	0,21
15	35	0,56	0,52	0,31	0,46	0,04	0,10	0,09	0,08

*M.W. = Mittelwerte aus 3 Bestimmungen

Bei 12 weiblichen gesunden erwachsenen Versuchspersonen (Tabelle 6) fanden wir einen Mittelwert von 0,55 mg % (s = 0,113, V = 20,6 %) im Serum und von 0,16 mg % (s = 0,062, V = 39,4 %) im Harn (Fehlerrechnung s. Anhang).

Tabelle 6 Kreatinkonzentrationen in Serum und Harn von 12 weiblichen gesunden Versuchspersonen im Erwachsenenalter

Pro-band Nr.	Alter Jahre	Serum-Kreatin (mg%) 1.Tag	2.Tag	3.Tag	M.W.*	Harn-Kreatin (mg%) 1.Tag	2.Tag	3.Tag	M.W.
1	25	0,56	0,50	0,55	0,54	0,08	0,09	0,05	0,07
2	24	0,71	0,55	0,85	0,70	0,15	0,17	0,10	0,14
3	24	0,48	0,53	0,55	0,52	0,07	0,06	0,16	0,09
4	34	0,39	0,51	0,46	0,45	0,09	0,15	0,10	0,11
5	24	0,74	0,63	0,69	0,69	0,20	0,15	0,18	0,18
6	28	0,65	0,68	0,61	0,65	0,18	0,21	0,10	0,16
7	27	0,41	0,37	0,59	0,46	0,25	0,28	0,18	0,24
8	18	0,51	0,52	0,46	0,50	0,09	0,05	0,15	0,10
9	29	0,39	0,33	0,38	0,37	0,20	0,18	0,15	0,18
10	20	0,44	0,50	0,39	0,44	0,24	0,28	0,25	0,26
11	18	0,38	0,60	0,69	0,56	0,30	0,19	0,20	0,23
12	22	0,68	0,72	0,69	0,70	0,15	0,10	0,15	0,13

*M.W. = Mittelwerte aus 3 Bestimmungen

Eine gegenüber Männern signifikant erhöhte Kreatinausscheidung bei Frauen, wie sie von fast allen Autoren angegeben wird, haben wir nicht gefunden. Die Ursache hierfür sehen wir in dem Faktor, daß sowohl unsere weiblichen als auch unsere männlichen Versuchspersonen einer ausgewählten Gruppe junger muskelstarker Erwachsener angehörten.

VII. KASUISTIK

Im Rahmen einer Untersuchung an einem nicht ausgewählten Krankengut prüften wir mit unserer Kreatinnachweismethode von insgesamt 160 Patienten der urologischen Universitätsklinik die Kreatinkonzentrationen in Serum und Harn. Von diesen Patienten wurden außerdem die Serum- und Harnwerte von Kreatinin und Harnstoff ermittelt.

Die Entnahme der Blut- und Harnproben erfolgte unter den in Kapitel VI beschriebenen Bedingungen. Bei Patienten mit Dauerkatheter wurden die Harnproben unmittelbar vor der Untersuchung aus dem Katheter entnommen.

Die Untersuchung brachte folgende Ergebnisse:

a) Es besteht keine Korrelation zwischen der Harnstoff- und Kreatininausscheidung einerseits und der Kreatinkonzentration im Harn andererseits.

b) Eine hohe Kreatinausscheidung wird nicht von einer entsprechenden Serumkreatinkonzentration begleitet.

c) Bei 45 % der untersuchten Patienten fanden wir in Serum und Harn Kreatinkonzentrationen, die im Bereich der von uns angegebenen Normalwerte

lagen.

d) Bei etwa einem Drittel der Patienten lag die Kreatinausscheidung 10 - 15 % über unseren Normalwerten. Da es sich dabei aber um Kranke handelte, die seit über 14 Tagen bettlägerig waren, ist die hier gefundene Kreatinurie sicher auf eine lange Immobilisation (24) zurückzuführen.

e) 25 % der Untersuchten zeigten eine signifikante Kreatinurie, wobei in Einzelfällen die Kreatinausscheidung um den Faktor 10^3 über den von uns gefundenen Normalwerten lag.

In der Gruppe der zuletzt genannten Patienten befanden sich vor allem Kranke mit Nierenprozessen, die mit einem progredienten Schwund bzw. einer Zerstörung des Nierenparenchyms einhergehen, und Frischoperierte.

Die Tabelle 7 zeigt, daß bei den Frischoperierten der Intensiv-Pflegestation je nach dem Schweregrad der Operation ganz erhebliche Kreatinkonzentrationen im Harn auftreten, während der Serumkreatinspiegel den Normbereich nicht wesentlich übersteigt. Durch die bei der Operation gesetzten Gewebszerstörungen und die nachfolgenden Parenchymuntergänge werden größere Mengen Kreatin freige-

setzt und über die Nieren ausgeschieden.

Tabelle 7 Serum- und Harnwerte von 10 Patienten der Intensiv-Pflegestation am 1. - 3. postoperativen Tag

Pat. Nr.	Alter Jahre	Serum-Werte (mg%) Harnstoff	Kreatinin	Kreatin	Harn-Werte (mg%) Harnstoff	Kreatinin	Kreatin
1	53 ♀	12	1,0	1,2	580	380	22,0
2	42 ♀	16	0,8	1,5	960	210	44,0
3	31 ♂	19	1,1	1,0	1360	185	104,0
4	25 ♂	10	1,7	1,5	1360	235	17,5
5	44 ♂	33	0,9	1,9	1350	166	76,0
6	63 ♀	25	0,7	1,4	805	91	104,0
7	67 ♀	10	1,3	1,2	800	240	127,0
8	49 ♂	19	1,0	1,1	1640	246	142,0
9	30 ♀	12	0,9	1,0	1030	187	26,4
10	40 ♀	20	1,2	1,3	182	180	30,8

Bereits 2 Wochen nach der Operation nähert sich die Kreatinelimination im Harn wieder dem Normbereich (Tabelle 8).

Tabelle 8 Serum- und Harnwerte der Patienten von Tabelle 7 am 12. - 15. postoperativen Tag

Pat. Nr.	Alter Jahre	Serum-Werte (mg%) Harnstoff	Kreatinin	Kreatin	Harn-Werte (mg%) Harnstoff	Kreatinin	Kreatin
1	53 ♀	15	1,0	0,8	480	350	0,5
2	42 ♀	13	0,8	0,5	560	240	0,9
3	31 ♂	10	0,8	0,9	780	210	1,2
4	25 ♂	14	1,3	0,7	970	280	0,5
5	44 ♂	29	1,0	1,2	1230	230	3,8
6	63 ♀	20	0,8	1,0	840	180	2,0
7	67 ♀	15	1,2	0,6	790	290	1,9
8	49 ♂	20	1,2	0,9	1250	280	1,5
9	30 ♀	10	0,8	0,8	810	260	0,7
10	40 ♀	15	1,0	1,0	380	170	0,6

Bei Patienten mit Nierensteinleiden, Nierencysten und Schrumpfnieren, also Erkrankungen, die mit Nierenparenchymuntergängen verbunden sind, stellten wir eine erhöhte Kreatinausscheidung fest. In Tabelle 9 sind die Werte von 10 erwachsenen Patienten zusammengefaßt. Bei annähernd normalen Serum-Kreatinkonzentrationen fanden wir im Harn Kreatinmengen vor, die teilweise das 100-fache der Norm überstiegen. Auch bei diesen Patienten scheint die Kreatinelimination vom Ausmaß der Nierenparenchymzerstörung abhängig zu sein, jedoch ergab sich keine Korrelation zwischen den erhöhten Harn-Kreatinwerten und der Ausscheidung von Kreatinin und Harnstoff.

Tabelle 9 Serum- und Harnwerte von 10 Patienten mit Nierenleiden, die von einem Schwund des Nierenparenchyms begleitet werden

Pat. Nr.	Alter Jahre		Serum-Werte (mg%) Harnstoff	Kreatinin	Kreatin	Harn-Werte (mg%) Harnstoff	Kreatinin	Kreatin
1	68	♂	17	1,5	0,35	1160	182	28,6
2	53	♀	27	0,8	1,9	1140	156	22,0
3	43	♀	19	1,0	0,85	1000	154	10,4
4	33	♀	17	1,0	0,9	700	10	3,15
5	49	♂	14	1,0	0,5	2050	280	3,1
6	48	♂	38	2,0	0,9	920	136	2,65
7	43	♀	17	1,1	0,7	495	42	12,2
8	37	♀	9	0,6	0,6	495	83	20,6
9	46	♀	17	0,9	0,6	325	56	16,9
10	30	♀	42	1,9	1,0	1030	187	14,2

Aus dem Krankengut der Tuberkulosestation der Urologischen Universitäts-Klinik untersuchten wir Harn und Seren von 14 erwachsenen Patienten, bei denen anamnestisch seit Jahren eine Urogenital-Tuberkulose bekannt war. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 10 zusammengefaßt und entsprechen im wesentlichen unseren Normalwerten.

Tabelle 10 Serum- und Harnwerte von 14 erwachsenen Patienten mit Urogenital-Tuberkulose

Pat. Nr.	Alter Jahre	Serum-Werte (mg%) Harnstoff	Kreatinin	Kreatin	Harn-Werte (mg%) Harnstoff	Kreatinin	Kreatin
1	53 ♂	17	1,0	0,4	910	230	0,3
2	38 ♀	16	1,0	0,35	1170	205	0,35
3	40 ♂	31	3,1	0,2	1240	235	0,4
4	46 ♂	13	1,0	0,3	365	52	0,6
5	68 ♀	24	1,2	0,8	515	62	0,8
6	27 ♂	13	1,0	0,25	650	112	1,4
7	54 ♂	13	1,1	0,3	1500	265	1,9
8	30 ♂	13	0,8	0,85	530	117	1,95
9	41 ♂	20	0,9	0,3	1400	250	2,0
10	34 ♂	13	1,4	0,7	1285	255	2,0
11	35 ♀	20	0,9	0,5	570	153	2,35
12	33 ♂	21	1,1	0,7	2140	325	3,0
13	31 ♂	15	1,1	0,5	1560	338	3,9
14	42 ♂	29	2,1	0,2	390	86	4,0

Die Untersuchung führte jedoch zu einem interessanten Nebenergebnis. Es stellte sich heraus, daß alle Patienten mit einer Kreatinelimination von mehr als 1,5 mg % mit dem gleichen Tuberkulostatikum (Rifampicin) behan-

delt wurden. Um den Einfluß dieses Medikamentes auf die Kreatin- und Kreatininuntersuchung zu überprüfen, lösten wir den Inhalt einer Kapsel Rifampicin (160 mg Trockensubstanz) in destilliertem Wasser und stellten eine Verdünnungsreihe her. Die Proben wurden dann mit dem Autoanalyzer auf "scheinbares" Kreatin und Kreatinin untersucht. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11 Beeinflussung der Kreatin- und Kreatininuntersuchung durch Rifampicin

1 Kapsel Rifampicin = 160 mg Trockensubstanz gelöst in dest. Wasser	vorgetäuschtes Kreatin in mg%	vorgetäuschtes Kreatinin in mg%
1. in 300 ml gelöst	0,4	1,0
2. in 200 ml gelöst	0,6	1,3
3. in 100 ml gelöst	1,15	1,6

Bei genügend hoher Blutkonzentration bzw. Ausscheidungsrate können also durch dieses Medikament zusätzliche Mengen von Kreatin bzw. Kreatinin vorgetäuscht werden. Angesichts dieser Tatsache stellt sich die Frage, ob die Kreatinin-Clearance der mit Rifampicin behandelten Patienten noch eine diagnostische Aussagekraft besitzt.

Von 8 Kindern der Universitäts-Kinderklinik Homburg, bei denen die Diagnose "progressive Muskeldystrophie" auf Grund der anamnestischen Erhebungen sowie der üblichen Untersuchungs- und Laborbefunde als gesichert angesehen werden konnte, untersuchten wir Serum und Harn.

Da in vivo Kreatinin nur durch den Zerfall von Kreatinphosphat entsteht und bei dieser Erkrankung die Phosphorilierungsvorgänge im Muskel gestört sind, erbrachte unsere Untersuchung erwartungsgemäß einen niedrigen Serum-Kreatininspiegel, leicht erhöhte bis normale Serum-Kreatinkonzentrationen und eine weit über der Norm liegende Kreatinelimination im Harn. Die Werte sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

Tabelle 12 Serum- und Harnwerte von 8 Kindern im Alter von 6 bis 14 Jahren der Universitäts-Kinderklinik Homburg mit progressiver Muskeldystrophie

Pat. Nr.		Serum-Werte (mg%) Harnstoff	Kreatinin	Kreatin	Harn-Werte (mg%) Harnstoff	Kreatinin	Kreatin
1	♀	15	0,5	0,7	1220	231,0	10,5
2	♀	20	0,3	1,1	650	44,0	92,5
3	♂	8	0,3	1,3	905	35,7	63,0
4	♂	13	0,2	1,4	1765	81,9	189,0
5	♂	17	0,2	1,6	1640	84,0	325,0
6	♂	12	0,2	1,2	1790	54,6	264,0
7	♂	19	0,2	1,3	1220	94,6	220,0
8	♂	9	0,2	1,3	1300	136,0	168,0

VIII. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Position des Kreatins im Stoffwechselgeschehen und seine Bedeutung für Nachweis und Diagnose verschiedener Erkrankungen der Muskulatur und des Hautsystems haben uns veranlaßt, eine verbesserte Bestimmungsmethode zu suchen, die sich durch Zuverlässigkeit auszeichnet und auch für Reihenbestimmungen geeignet ist. Wir entschlossen uns, mit Hilfe der Diacetyl-α-Naphthol-Reaktion eine Kreatin-Nachweismethode zu erarbeiten, die eine direkte Kreatin-Bestimmung in Körperflüssigkeiten mit dem Autoanalyzer gestattet.

2. Die vorstehenden Untersuchungsergebnisse beweisen, daß unsere Methode ein empfindlicher, reproduzierbarer, automatischer, quantitativer Nachweis zur Bestimmung von Kreatin in Serum, Harn bzw. biologischen Flüssigkeiten ist.

3. Zur Erzielung exakter Ergebnisse in der Größenordnung von 0 - 100 ppm (0 - 10 mg %) brauchen wir bei unseren Bestimmungen im Gegensatz zu den Untersuchungsmethoden anderer Autoren keine Störfaktoren zu berücksichtigen.

   Bei einer Konzentration von 50 ppm (5 mg %) Kreatin beträgt der Variationskoeffizient V = 1,05 %, womit

eine gute Reproduzierbarkeit in Serie gegeben ist. Die Wiederfindungsquote in Harn und Serum beträgt 100 %, der Fehler liegt im Bereich des Variationskoeffizienten.

4. Wegen der hohen Harn-Kreatinin-Konzentration und der (nur in vitro) ständigen Umwandlung von Kreatinin in Kreatin im alkalischen Milieu ist die Voraussetzung für eine korrekte Bestimmung der effektiven Kreatinkonzentration im Harn eine sofortige Verarbeitung des frisch gelassenen Urins.

5. Soll Kreatin im 24-Stunden-Harn ermittelt werden, so müssen die einzelnen Harnportionen bei + 4° C gesammelt werden.

   Eingefrorene Harn- und Serumproben ergeben auch nach Wochen völlig identische Resultate mit den sofort untersuchten Proben. Diese Tatsache ermöglicht ein rationelles Arbeiten auch dann, wenn nur wenige Kreatinuntersuchungen pro Woche anfallen. Die Proben können gesammelt und dann in einem Arbeitsgang analysiert werden.

6. Bei einer Gruppe gesunder muskelstarker Männer und Frauen im Alter zwischen 18 und 40 Jahren fanden wir bei 15 Männern als Mittelwert $\bar{x}$ = 0,56 mg %

(s = 0,095, V = 17,0 %) Kreatin im Serum und im Harn $\bar{x}$ = 0,141 mg % (s = 0,049, V = 34,8 %), bei 12 Frauen einen Mittelwert von $\bar{x}$ = 0,55 mg % (s = 0,113, V = 20,6 %) Kreatin im Serum und $\bar{x}$ = 0,16 mg % (s = 0,062, V = 39,4 %) im Harn.

7. Von insgesamt 160 Patienten der Urologischen Universitätsklinik prüften wir mit der von uns erarbeiteten Nachweismethode die Kreatinkonzentrationen in Serum und Harn.

Bei 45 % der Patienten fanden wir Kreatinkonzentrationen, die im Bereich unserer Normalwerte lagen, und rund 30 % zeigten bei normalen Serumwerten eine um 10 - 15 % erhöhte Kreatinausscheidung im Harn, die aber sicher auf eine lange dauernde Immobilisation zurückzuführen ist.

Nur bei 25 % der untersuchten Patienten stellten wir bei annähernd normalen Kreatinkonzentrationen im Serum eine stark erhöhte Kreatinelimination im Harn fest, wobei in Einzelfällen die Ausscheidungsrate um den Faktor 10^3 über den von uns gefundenen Normalwerten lag. Zu dieser Gruppe gehörten Kranke mit Nierenprozessen, die mit einem progredienten Schwund bzw. einer Zerstörung des Nierenparenchyms einhergehen, und Frischoperierte mit erheblichen Weichteilverletzungen.

8. Bei 8 Kindern der Universitäts-Kinderklinik Homburg mit progressiver Muskeldystrophie fanden wir erwartungsgemäß einen niedrigen Serum-Kreatininspiegel, leicht erhöhte bis normale Serum-Kreatinkonzentrationen und einen Kreatingehalt im Harn zwischen 10,5 und 325 mg %.

IX. ANHANG

Fehlerrechnung zum Versuch über die Reproduzierbarkeit in Serie (S. 34)

n	Extinktionen x	$(x - \bar{x})$	$(x - \bar{x})^2$
1	65	732	35824
2	65	732	535824
3	66	10732	115175824
4	64	9268	85895824
5	64	9268	85895824
6	65	732	535824
7	66	10732	115175824
8	65	732	535824
9	65	732	535824
10	66	10732	115175824
11	65	732	535824
12	65	732	535824
13	64	9268	85895824
14	65	732	535824
15	65	732	535824
16	66	10732	115175824
17	65	732	535824
18	65	732	535824
19	64	9268	85895824
20	66	10732	115175824
21	64	9268	85895824
22	65	732	535824
23	64	9268	85895824
24	66	10732	115175824
25	66	10732	115175824
26	65	732	535824
27	65	732	535824
28	65	732	535824
29	64	9268	85895824
30	64	9268	85895824
31	65	732	535824
32	64	9268	85895824
33	64	9268	85895824
34	65	732	535824
35	65	732	535824
36	64	9268	85895824
37	65	732	535824
38	66	10732	115175824
39	65	732	535824
40	65	732	535824
41	65	732	535824
	Σ 2662		Σ 18780048784

$n = 41$

$\bar{x} = 64{,}9268$

$s = 0{,}6852$

$V = 1{,}05\ \%$

Fehlerrechnung zum Kapitel Normalwerte (S. 35)

1. Kreatin-Normalwerte im Serum von gesunden männlichen Versuchspersonen

n	x
1	0,62
2	0,66
3	0,59
4	0,47
5	0,61
6	0,62
7	0,59
8	0,43
9	0,55
10	0,65
11	0,64
12	0,55
13	0,33
14	0,61
15	0,46
	Σ 8,38

$n = 15$

$\bar{x} = 0{,}5587$

$s = 0{,}095$

$V = 17{,}0\ \%$

2. Kreatin-Normalwerte im Harn von gesunden männlichen Versuchspersonen

n	x
1	0,21
2	0,13
3	0,15
4	0,11
5	0,11
6	0,14
7	0,13
8	0,23
9	0,19
10	0,10
11	0,11
12	0,14
13	0,07
14	0,21
15	0,08
	Σ 2,11

$n = 15$

$\bar{x} = 0,1407$

$s = 0,0489$

$V = 34,8\ \%$

3. Kreatin-Normalwerte im Serum von gesunden weiblichen Versuchspersonen

n	x
1	0,54
2	0,70
3	0,52
4	0,45
5	0,69
6	0,65
7	0,46
8	0,50
9	0,37
10	0,44
11	0,56
12	0,70
	Σ 6,58

$n = 12$

$\bar{x} = 0,5483$

$s = 0,113$

$V = 20,6\ \%$

4. Kreatin-Normalwerte im Harn von gesunden weiblichen Versuchspersonen

n	x
1	0,07
2	0,14
3	0,09
4	0,11
5	0,18
6	0,16
7	0,24
8	0,10
9	0,18
10	0,26
11	0,23
12	0,13
	Σ 1,89

$n = 12$

$\bar{x} = 0,1575$

$s = 0,0621$

$V = 39,4\ \%$

X. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALKEN, C.E., V.W. DIX, H.M. WEYRAUCH, E. WILDBOLZ: Handbuch der Urologie. Springer Verlag, Heidelberg Bd. II, 718 (1965)

2. ANDES, J.E. und V.C. MYERS: Guanidine-like substances in the blood. II.Blood guanidine in nitrogen retention and hypertension. J.Laborat.Clin.Med.S.Louis 22, 1209 (1937)

3. BARRIET, M.M.: The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α-naphthol. J.Pathol.Bacteriol 42, 441 (1936)

4. BENEDICT, S.R.: Studies in creatine and creatinine metabolism. II. The estimation of creatine. J.Biol.Chemistry 18, 191 (1914)

5. BERNDT, E., H.U. BERGMEYER und H. MÖLLERING: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim (1962)

6. BEYER, H.: Lehrbuch der organischen Chemie. Hirzel Verlag, Leipzig 13./14. Aufl., 229-747 (1967)

7. BLOCH, K. und R. SCHOENHEIMER: Studies in protein metabolism. XI. The metabolic relation of creatine and creatinine studied with isotopic nitrogen. J.Biol.Chem. 131, 111 (1939)

8. BLOCH, K. und R. SCHOENHEIMER: The biological formation of creatine. J.Biol.Chem. 133, 633 (1940)

9. BLOCH, K. und R. SCHOENHEIMER: Rate of formation and disapperance of body creatine in normal animals. J.Biol.Chem. 138, 155 (1941)

10. BODANSKY, M., V.B. DUFF and C.L. HERRMANN: Comparison of Glycine and guanido-acetic acid as precursors of creatine. J.Biol.Chem. 115, 641 (1936)

11. BORSOOK, H. and J.W. DUBNOFF: The formation of glycocyamine in animal tissues. J.Biol.Chem. 138, 389 (1941)

12. BORSOOK, H. and J.W. DUBNOFF: The hydrolyses of phospho-creatine and the origine of urinary creatine. J.Biol.Chem. 168, 493 (1947)

13. BRIEGER, H.: Der Kreatingehalt im Serum gesunder und kranker Kinder. Zeitschr. für Kinderheilkunde 89, 26 (1964)

14. BÜCHNER, F., E. LETTERER und F. RONLET: Handbuch der allgemeinen Pathologie. Springer Verlag, Berlin Bd. II, 349 (1957)

15. CHEVREUL, M.: Recherches sur la composition chimique du bouillon de viandes. J.Pharmacie Chim. 21, 231 (1835)

16. CHRISTEN, H. R.: Lehrbuch der Chemie. Otto Salle Verlag, Frankfurt 3. Auflage 1965

17. DUNICZ, B.L.: Simple and accurate method for the determination of creatine and creatinine. Clin.Chim.Acta 9, 203 (1964)

18. EGGLETON, P. and G.P. EGGLETON: Inorganic phosphate and labile form of organic phosphate in gastrocnemius of frog. Biochem.J. 21, 190 (1927)

19. EGGLETON, P., S.R. ELSDEN and N. GOUGH: The estimation of creatine and of diacetyl. Biochem.J. 37, 526 (1943)

20. FANCONI, G. und A. WALLGREEN: Lehrbuch der Pädiatrie. Schwabe & Co. Verlag, Stuttgart/Basel (1964)

21. FISCHL, J.S., S. SEGAL und Y. YULZARI: Separation of creatine and creatinine by "small-volume" electrophoresis. Clin.Chim.Acta 10, 73 (1964)

22. FLASCHENTRÄGER, B. und E. LEHNARTZ: Physiologische Chemie. Springer Verlag, Berlin (1966)

23. FREY, E. und F. SUTTER: Handbuch der inneren Medizin. Springer Verlag, Göttingen Bd. 8 (1951)

24. GEIGY: Wissenschaftliche Tabellen. Basel, 7. Aufl. (1968)

25. GOETZE, E.: Lehrbuch der pathologischen Physiologie. Gustav Fischer Verlag, Jena (1964)

26. GOLDMANN, R. und J.X. MOSS: Synthese von Kreatin in nephrektomierten Ratten. Amer.J.physiol. 197, 865 (1959)

27. GRIFFITH, W.: The determination of creatine in body flinds and muscle, and of phosphocreatine in muscle, using the autoanalyzer. J.Clin.Chim.Acta 9, 213 (1964)

28. GRUNDER, G. und G. SEIGE: Kinderheilkunde: Diagnostik - Therapie - Prophylaxe. Hippokrates Verlag, Stuttgart 26 (1968)

29. GUNDLACH, G., G.F. HOPPE-SEYLER und H. JOHANN: Die automatische Kreatinbestimmung mit Hilfe der Diacetylreaktion. Z.Klin.Chem. 5, 415 (1968)

30. HALLER, H. und S.E. STRANZENBERG: Ein Beitrag zur Bestimmung von Biguaniden, Kreatinin und Kreatin im Harn. Ärztl.Forsch. 20, 415 (1966)

31. HEGGLIN, R.: Differentialdiagnose innerer Krankheiten. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 11. Aufl. (1969)

32. HOBERMANN, H.D., A.H. SIMS und J.H. PETERS: Creatine and creatinine metabolism in the normal male adult studied with the aid of isotopic nitrogen. J.Biol.Chem. 172, 45 (1948)

33. HOBERMANN, H.D., A.H. SIMS und W.W. ENGSTROM: The effect of methyltestosterone on the rate of synthesis of creatine. J.Biol.Chemistry 173, 111 (1948)

34. JADASSOLEN, J.: Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten. Springer Verlag, Berlin Bd. 6, Teil 3 (1960)

35. KANIG, K.: Zur photometrischen Bestimmung von Kreatin mit der Diacetyl-Reaktion. Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 306, 247 (1957)

36. KARLSON, P.: Lehrbuch der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 5. Aufl. (1966)

37. KLAGES, F.: Lehrbuch der organischen Chemie. Walter de Gruyter Verlag, Berlin Bd. I, 618 (1959)

38. KREYSEL, H.W. und F. SCHANDELMAIER: Kreatin-Kreatininstudien sowie Fermentaktivitäts-Bestimmungen im Rahmen einer peroralen Kreatinbelastung bei Dermatomyositis. Kli.Wo. 21, 1087 (1964)

39. KREYSEL, H.W. und M. JÄNNER: Neue Aspekte zur Diagnostik der Dermatomyositis. Arch.Klin.Exp.Derm. 226, 229 (1966)

40. LABHART, A.: Klinik der Inneren Sekretion. Springer Verlag, Berlin (1957)

41. LANG, K.: Der intermediäre Stoffwechsel. Springer Verlag, Göttingen (1952)

42. LANGENBECK, W.: Lehrbuch der organischen Chemie. Verlag Theodor Steinkopff 143 (1955)

43. LAUBER, K.: Bestimmung von Kreatin in Serum und Urin. Z.Klin.Chem. 3, 119 (1966)

44. LEHNARTZ, E.: Einführung in die chemische Physiologie. Springer Verlag, Berlin 11. Aufl. (1959)

45. LEUTHARDT, F.: Lehrbuch der physiologischen Chemie. Walter de Gruyter Verlag, Berlin 15. Aufl. (1963)

46. LOHMANN, K.: Über die enzymatische Aufspaltung der Kreatinphosphorsäure, zugleich ein Beitrag der Muskelkontraktion. B.Z. 271, 264 (1934)

47. LOEFFLER, G.: Zur Frage des genetischen Einflusses auf die Ausscheidung von Kreatin und Kreatinin im Urin. Zwillings- und Familienuntersuchungen mittels Dünnschichtchromatographie. Humangenetik 1, 170 (1964)

48. LUNDSGAARD, E.: Untersuchungen über Muskelkontraktionen ohne Milchsäurebildung. B.Z. 217, 162 (1930)

49. LUNDSGAARD, E.: Weitere Untersuchungen über Muskelkontraktionen ohne Milchsäurebildung. B.Z. 227, 51 (1930)

50. MASSON ET CIE.: Traité de Biochimie Générale. Bd. I Paris 526 (1959)

51. MÜLLER-SEIFERT: Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik. J.V. Bergmann Verlag, München (1966)

52. PAUMGARTNER, G., O. KRAUPP und F.X. FISCHER: Papierchromatographische Auftrennung und Bestimmung von Kreatin und Kreatinin im Plasma. Clin.Chim.Acta 8, 960 (1963)

53. RAAFLAUB, J. und I. ABELIN: Über eine Methode der direkten Bestimmung des Kreatingehaltes des Harns. Biochem.Z. 321, 158 (1950)

54. RINK, M. und D. KREBBER: Dünnschichtchromatographische Bestimmung von Kreatinin und Kreatin im Harn. J.Chromatogr. 21, 143 (1966)

55. STURM, A.: Grundbegriffe der inneren Medizin und Neurologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 12. Aufl. (1968)

56. SULLIVAN, M.X., W.C. HESS und F. IRREVERRE: Studies in muscular dystrophies. The presence of simple guanidine derivatives in the urine. J.Biol.Chem. 114, 633 (1936)

57. TAUSSKY, H.: A procedure increasing the specificity of the Jaffé reaction for the determination of creatine and creatinine in urine and plasma. Clin.Chim.Acta 1, 210 (1956)

58. ZÖLLNER, N.: Thannhausers Lehrbuch des Stoffwechsels und der Stoffwechselkrankheiten. Thieme Verlag, Stuttgart 2. Aufl. (1957).

XI. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. rer. nat. G. Gundlach danke ich für die Überlassung des Themas sowie die freundliche Betreuung und Hilfe bei der Durchführung der oft schwierigen und langwierigen Versuchsreihen.

Herrn Prof. Dr. med. C. E. Alken danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes im Labor der Urologischen Universitätsklinik und die Erlaubnis zur Benutzung aller Einrichtungen des Instituts.

Auch Herrn Dr. med. G. F. Hoppe-Seyler schulde ich Dank für die vielen guten Ratschläge, die er mir im Verlauf meiner Arbeit immer wieder erteilte.

XII. LEBENSLAUF

Am 13. 3. 1935 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Peter J o h a n n (gestorben 1944) und seiner Ehefrau Hedwig, geborene Possin, (gestorben 1965) in Saarbrücken geboren. Von 1941 - 1946 besuchte ich die Volksschulen in Saarbrücken und Blankenburg i. Harz, von 1946 - 1952 die Knabenrealschule in Saarbrücken.

Im September 1952 begann ich bei der Firma Saarländisches Stahlwerk Dingler, Karcher & Cie. in Saarbrücken eine dreijährige kaufmännische Lehre. Nach bestandener Abschlußprüfung an der Berufsschule in Saarbrücken war ich von 1955 - 1963 in dieser Stahlgießerei als kaufmännischer Angestellter beschäftigt.

Ab Herbst 1960 besuchte ich das Staatliche Abendgymnasium in Saarbrücken und bestand im März 1964 die Reifeprüfung.

Im Mai 1964 begann ich an der Universität des Saarlandes das Medizinstudium. Am 8. 8. 1967 heiratete ich Fräulein Doris Bauer aus Saarbrücken. Während der vorklinischen und klinischen Semester studierte ich an der Universitätsklinik in Homburg und bestand hier vor dem Ausschuß für die ärztliche Prüfung am 13. 7. 1970 das medizinische Staatsexamen.

Seit 1. September 1970 bin ich als Medizinal-assistent in den Städtischen Krankenanstalten Winterberg in Saarbrücken beschäftigt.

Nach der Approbation strebe ich die fachärztliche Ausbildung für Innere Medizin an.